

DER EINFLUSS DER CO₂-KONZENTRATION AUF DEN
„INTRAZELLULÄREN pH“ BEI KONSTANTEM pH IM
EXTRAZELLULÄRRaum DER HÄMOGLOBINFREI
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

Karl-Heinz Halder

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555615_0093

Aus dem Institut für Physiologische Chemie,
Physikalische Biochemie und Zellbiologie
der Universität München

Vorstände: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher
Prof. Dr. E. M. Klingenberg - Prof. Dr. F. Miller
Prof. Dr. H. G. Zachau

DER EINFLUSS DER CO_2 -KONZENTRATION AUF DEN
"INTRAZELLULÄREN pH" BEI KONSTANTEM pH IM
EXTRAZELLULÄRRaum DER HÄMOGLOBINFREI
PERFUNDIERTEN RATTENLEBER

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl-Heinz Halder
aus München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H. Sies

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Th. Bücher

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Dez. 1977



Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>I. Einleitung</u>	1
<u>II. Methodik</u>	4
II. 1. Die hämoglobinfreie Leberperfusion	4
II. 2. Meßmethodik	7
II. 3. Analysen	8
II. 4. Messung des Inulin- und DMO-Raumes und Berechnung des intrazellulären pH	9
II. 5. Verwendete Chemikalien und Geräte	12
<u>III. Ergebnisse</u>	
III. 1. Methode zur Erfassung von Änderungen des intrazellulären pH	14
III. 1. 1. Theoretische Überlegungen	14
III. 1. 2. H^+ -Ionenbewegungen bei der Äquilibration von Monokarboxylatgradienten zwischen EZR und IZR der hämoglobinfrei perfundierten Leber	15
III. 1. 3. H^+ -Ionenbewegungen bei der Äquilibration von DMO- und CO_2 -Gradienten	20
III. 2. H^+ -Ionenbewegungen bei Monokarboxylatäquilibration in unterschiedlichem Kohlendioxidmilieu	22
III. 3. H^+ -Ionenbewegungen bei Monokarboxylatäquilibration bei Anwesenheit nichtflüchtiger Puffer	27

	Seite
III. 4. Abhängigkeit der intrazellulären Monokarboxylatkonzentration von der CO_2 -Konzentration außerhalb der Zelle	30
III. 5. Monokarboxylat-Monokarboxylat-Austausch bei verschiedenen CO_2 -Zuständen	33
<u>IV. Diskussion</u>	34
IV. 1. "Intrazellulärer pH-Wert"	34
IV. 2. Kohlendioxidkonzentration und intrazellulärer pH	36
IV. 3. Intrazellulärer pH-Wert bei permeablen und nicht permeablen Puffersystemen	37
IV. 4. Unterschiede zwischen aliphatischen und aromatischen Monokarboxylaten bezüglich der Translokation	40
IV. 5. Transportmechanismus von Bikarbonat und anderen Monokarboxylaten an der Zellmembran	41
IV. 6. Einfluß anderer Translokationsprozesse auf die gekoppelte Protonen-Monokarboxylat-Bewegung	42
IV. 7. Geschwindigkeit der Translokationsprozesse	43
IV. 8. Austausch von Monokarboxylaten gegen Monokarboxylate	44
<u>V. Zusammenfassung</u>	46
<u>VI. Literaturverzeichnis</u>	48

I. Einleitung

Kohlendioxid spielt an vielen Stellen des tierischen Organismus eine wichtige Rolle. Es hat zentrale Bedeutung beim CO_2/O_2 -Austausch zwischen den Lungenkapillaren und den Alveolen (vgl. Übersicht 1); außerdem für die Funktionen der Nervenzellen, des Gehirnstoffwechsels und für Reflexmechanismen im Herz-, Lungen- und Gefäßsystem (2,3); z. B. wird bei Erhöhung der CO_2 -Konzentration die Dauer des Aktionspotentials an der Purkinjefaser des Herzens verlängert (39).

CO_2 ist auch im Stoffwechsel, insbesondere im Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus von Bedeutung; beispielsweise bei Karboxylierungs- und Dekarboxylierungsreaktionen an biotinabhängigen Enzymen wie Acyl-CoA-Carboxylase oder Pyruvat-Carboxylase (4).

Darüberhinaus sind die relativen Konzentrationen von CO_2 und HCO_3^- - wegen der freien Permeabilität von CO_2 und eines pK_a , der mit 6.12 nahe dem physiologischen Zell-pH liegt - durch ihren Einfluß als Puffersystem grundlegend wichtig für den aktuellen pH-Wert innerhalb und außerhalb der Zelle.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem zuletzt genannten Aspekt und betrachtet den Transport von H^+ -Ionen, Kohlensäure und anderen Monokarbonsäuren durch die Zellmembran; dabei interessiert insbesondere die Frage, wie sich die absolute CO_2 -Konzentration auf den "intrazellulären pH" (pH_i) auswirkt (vgl. Diskussion über diesen Begriff auf S. 34).

Dazu wird eine neue Methode zur Erfassung von Änderungen des pH_i verwendet, bei welcher der

Zell- und Gewebsverband nicht zerstört wird. Diese Methode besteht in der Messung der H^+ -Ionenbewegung beim Ausgleich eines Monokarboxylatgradienten zwischen dem Intrazellulär- und Extrazellulärraum der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber (12,13). Mit Hilfe der Gibbs-Donnan-Beziehung lassen sich aus dem Ausmaß der H^+ -Ionenbewegung Rückschlüsse auf den intrazellulären pH ziehen. Bei variiertem CO_2 -Konzentration wird in diesen Versuchen der extrazelluläre pH konstant gehalten (sog. iso-pH-System) (4).

Die Ergebnisse werden verglichen mit einer anderen Methode, bei welcher aus der Verteilung der schwachen Säure 5,5-dimethyloxazolidin-2,4-dion (DMO) zwischen dem intra- und extrazellulären Raum auf Veränderungen des intrazellulären pH geschlossen wird, da der DMO-Gradient vom Unterschied zwischen extrazellulärem und intrazellulärem pH abhängt (20).

Es wird gefunden, daß der pH_i sich im iso-pH-System um 0.3 Einheiten unterscheidet, wenn man die CO_2 -Konzentration von 10 Vol.% auf 2.5 Vol.%, also um den Faktor 4, variiert.

Außerdem wird in dieser Arbeit gezeigt, wie sich der pH im Zellinnern verändert, sobald

man statt des bisher verwendeten $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ - Systems weniger permeable Puffersysteme (z. B. HEPES, MOPS) benutzt. Bei diesen Puffern können, im Vergleich zum $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -System, Veränderungen des pH_i um bis zu 0.5 pH-Einheiten vorkommen. Diese Beobachtungen haben Bedeutung für experimentelle Untersuchungen nicht nur in perfundierten Organen, sondern auch an isolierten Zellen und in Zellkulturen, wo diese nichtflüchtigen, zwitterionischen Puffersysteme neuerdings häufiger eingesetzt werden.

II. Methodik

II. 1. Die hämoglobinfreie Leberperfusion

Der intakten, im Gewebsverband verbliebenen Rattenleberzelle strömt über das Pfortader-Sinusoid-System eine künstliche hämoglobin- und eiweißfreie, isoosmotische Flüssigkeit, das "Perfusat", zu, welches nicht rezirkuliert (offenes Perfusionssystem). Diese Methode bietet den Vorteil, daß man die Extrazellulärflüssigkeit, welche der Leber fortwährend zuströmt in ihrer Zusammensetzung genau kennt und im Experiment exakt verändern kann. Konzentrationsunterschiede der abfließenden Flüssigkeit spiegeln direkt Veränderungen in der Abgabe oder Aufnahme von Substanzen durch die Gesamtheit der Zellen wider; weiterhin kann man trotz physiologischer Variationsbreite eine immer identische Zusammensetzung von Leberzellen benützen, um die Konzentrationsabhängigkeit oder die Reversibilität eines Effektes zu testen.

Präparation der Rattenleber

Für die Versuche werden 150 - 180 g schwere mit Altromin Standardnahrung gefütterte männliche Ratten, Stamm Wistar II (Fa. Thomae, Bibberach an der Riss) verwendet. Zur Operation werden die Tiere mit Nembutal^R 50 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal narkotisiert. In die linke V. femoralis injiziert man 1000 IU/kg Körpergewicht Liquemin^R und eröffnet das Abdomen mit einem medianen Bauchdeckenschnitt, wo nach Abschieben des Darmes die Pfortader mit einem Polyäthylen-Katheter kanüliert wird.

Via rechter Vorhof erreicht eine zweite Kanüle die V. cava inf.; sie dient zur Ableitung des ausfließenden Perfusats.

Aufbau der Apparatur

Die Perfusionslösung (Zusammensetzung s. Tab. 1) wird vor Eintritt in die Leber in einem rotierenden Zylinderoxygenator mit einem wasserdampf-gesättigten Gasgemisch O_2/CO_2 äquilibriert und so erwärmt, daß die am Leberlappen mit einem Thermoelement (Typ E 5, Fa. Ellab) gemessene Temperatur $33^{\circ}C$ beträgt. Über T-Stücke kann man kontinuierlich oder diskontinuierlich genau definierte Mengen Substanz aus konzentrierten und neutralisierten Stammlösungen in das zu-strömende Medium zugeben, wobei man an Präzisions-mikropumpen die Pumpmenge der Stammlösungen stufenweise verändern kann. Durch die 6 bis 8 g schweren Lebern fließt das Perfusat mit einer Geschwindigkeit von 18 - 22 ml/min, bei einem hydrostatischen Druck von 25 cm H_2O (größere Flußraten führen leicht zu einer Ödematisierung des Gewebes (5)). Das durch den Katheter in der unteren Hohlvene abfließende Perfusat mündet zur kontinuierlichen Messung von H^+ -Ionen-konzentration und O_2 -Konzentration in zwei kommunizierenden Elektrodenkammern.

Perfusionsflüssigkeit

Standardperfusionsmedium ist eine modifizierte Krebs-Ringer-Lösung (Tab. 1) (6), die mit einem O_2/CO_2 -Gemisch von 95/5, v/v aufgesättigt wird (12,17). Die Medien ohne CO_2 werden mit nahezu 100% Sauerstoff aufgesättigt und enthalten als Puffersubstanzen DMO bzw. HEPES bzw. MOPS. Sie werden durch Zugabe von NaCl iso-osmotisch gemacht.

Tabelle 1

Die Zusammensetzung der verwendeten Perfusionsmedien ist verschieden hinsichtlich ihres O_2/CO_2 -Verhältnisses und, um isoosmotische und iso-pH-Bedingungen zu schaffen, entsprechender Veränderungen bei Bikarbonat und Chlorid.

Substanzen in mmol/ltr	Puffersysteme			
	"0% CO_2 "		"2.5% CO_2 "	"10% CO_2 "
	DMO	HEPES	MOPS	Standard
Begasung:				
O_2/CO_2 , v/v	100:0		97.5:2.5	95:5
				90:10
CO_2			0.6	1.2
$NaHCO_3$			16	25
NaCl	115	136	133	115
HEPES		8.6		95
MOPS			7.43	
DMO	26			
außerdem enthalten alle Medien folgende Salze:				
KCl			5.9	
$CaCl_2$			2.5	
$MgCl_2$			1.18	
NaH_2PO_4			1.24	
Na_2SO_4			1.2	

Die mit "2.5% CO₂" und "10% CO₂" bezeichneten Perfusionslösungen enthalten Bikarbonat, um ähnliche Perfusat-pH-Werte zu erreichen und zur Wahrung gleicher Osmolarität Chlorid. Sofern nicht näher angegeben findet Standardmedium Verwendung. Während der ganzen Perfusion werden L-Laktat und Pyruvat als Natriumsalz im Verhältnis 4 : 1 infundiert und ergeben im Perfusat Werte von 0.8 mM bzw. 0.2 mM. (Sie dienen zur Versorgung der Leber mit Nährstoffen.)

II. 2 Meßmethodik

Messung der H⁺-Ionenkonzentration

Vor und nach jedem Versuch wird zur Eichung 0.1 n titrierte HCl in verschiedenen Konzentrationen in das zufließende Perfusat gegeben; es ergibt sich ein $\Delta \text{pH} / \Delta [\text{H}^+]$, der in dem kleinen Meßbereich praktisch konstant ist; Methansulfonsäure ergibt ähnliche Werte. Anhand der H⁺-Eichung und der Durchflußgeschwindigkeit (ml/min) werden die H⁺-Flußraten ($\mu\text{Mole H}^+ / \text{min}$) berechnet. Die Netto-H⁺-Ionenaufnahme errechnet sich aus der Fläche, die begrenzt wird durch die Auslenkung der pH-Linie und einer Tangente, die vom stationären pH bei Beginn der Monokarboxylatinfusion zur pH-Linie kurz vor Infusionsstopp verläuft. Diese Fläche wird planimetrisch bestimmt.

Messung der Monokarboxylate

Das abfließende Perfusat erreicht über Polyäthylen-schläuche eine Quarzdurchflußküvette. Hier erfolgt die kontinuierliche Registrierung des Benzoatgehalts am Hitachi-Spektrophotometer Modell 181 UV-VIS durch Messung der Absorption bei 273 nm.

II. 3. Analysen

Metabolitanalysen

Die Perfusatproben werden nicht enteiweißt, da sich keine störenden Enzymaktivitäten fanden. Die Metabolitanalysen erfolgen als einfache oder gekoppelte optische Tests in Anlehnung an (7) bei Zimmertemperatur. Ein Autoanalyser testet Pyruvat und Laktat. Die Extinktion vor Beginn der Reaktion liefert ein Referenzgemisch, das außer der zu testenden Substanz die gleiche Zusammensetzung wie das Testgemisch aufweist.

- | | | |
|--------------------|-------------|---|
| <u>1. Pyruvat:</u> | 500 μ l | 0.1 M TRA pH 7.6,
0.2 mM NADH,
2 Einheiten LDH (Schweinemuskel) |
| | 100 μ l | Perfusat |
| <u>2. Laktat:</u> | 500 μ l | 0.5 M Glycin,
0.4 mM Hydrazinhydrat pH 9.1,
1.5 mM NAD,
3 Einheiten LDH (Schweinemuskel) |
| | 100 μ l | Perfusat |

Die Konzentration berechnet sich bei den photometrischen Tests nach dem Lambert-Beerschen Gesetz, wobei ein Extinktionskoeffizient von $6.22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 340 nm und von $3.3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ bei 365 nm zugrundegelegt wird.

Bereitung eines sauren Extraktes

Um die Metabolitspiegel im Lebergewebe zu bestimmen, wird vom gut zugänglichen unteren Leberlappen mit einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Aluminiumspezialzange ein Gewebsstück entnommen. Das Gewebsplättchen von ca. 1 mm Dicke wird in der Kälte zermörsert und 400 - 500 mg werden davon abgewogen. Zur Herstellung eines sauren Extraktes versetzt man das Gewebspulver mit der fünf-

fachen Menge 0.6 N Perchlorsäure (5:1, ml:mg) und die Perfusatproben mit 2 N HClO_4 (5:1, ml:ml) und beschallt das Gewebe mit einem MSE-sonifier. In einem Trockenschrank von 80°C wird das Inulin drei Stunden lang einer sauren Hydrolyse unterworfen. Nach 6-minütigem Zentrifugieren bei 8000 Upm neutralisiert man den Überstand mit 3 N KOH auf pH 6.9 - 7.2. Danach zentrifugiert man das ausgefallene Kaliumchlorat ab (Überstand). Das Extraktvolumen pro Gramm Gewebe beträgt dann:

$$\frac{(P + W) \times K}{\bar{U} \times G} \quad (\text{ml/g})$$

wobei P: zugefügte Perchlorsäure in ml
W: Gewebswasser in ml
(hier 0.8, genauer 0.814 (n=13))
K: durch Zugabe von 3 N KOH auf pH 6.9-7.2
gebrachter Überstand in ml
 $\bar{U}$: Überstand nach Zentrifugation in ml
G: Gewebseinwaage in g

II. 4. Messung des Inulin- und DMO-Raumes und Berechnung des intrazellulären pH

Nach Conway (8) wird die H^+ -Konzentration im Zellinnern durch Messung der intra- und extrazellulären Konzentration von schwachen organischen Säuren und Basen ermittelt. Waddell und Butler fanden 1959 in der schwachen Säure DMO eine fast ideale Substanz für solche Zwecke und errechneten den pH_i nach folgender Formel (20):

$$pH_i = pK_a + \log \left\{ \frac{C_t}{C_e} \left(1 + \frac{V_e}{V_i} \right) - \frac{V_e}{V_i} \right\} \times \left[10^{(pH_e - pK_a)} + 1 \right] - 1 \left\{ \right.$$

wobei: V_i = Volumen des intrazellulären Wassers = $V_t - V_e$

V_t = Gesamtwassergehalt

V_e = Volumen des extrazellulären Wassers

= Inulinraum

C_t = Konzentration von DMO im Gewebswasser

C_e = Konzentration von DMO im extrazellulären Gewebswasser

Später wurden die Methoden auf die Verwendung von ^{14}C -markiertem DMO angepaßt; dabei ergab sich eine Übereinstimmung zwischen der Isotopen- und der chemischen Methode.

Zur Bestimmung des "overall"- pH_i der perfundierten Leber benutzt man hier radioaktiv markiertes 5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion ($2\text{-}^{14}\text{C}$ -DMO) mit einer spezifischen Aktivität von 11 mCi/mmol, das vorher im Exsikkator von Äthylazetat befreit wurde. Die Verteilung von DMO zwischen dem IZR und EZR erfolgt nach Gleichung I (S. 23), wobei $f_e/f_i = 1$ (21). Gleichzeitig wird der EZR mit ^3H -markiertem Inulincarboxylat mit einer spezifischen Aktivität von 83.7 mCi/g bestimmt. (Beide Substanzen von New England Nuclear, Boston). Nach zwanzigminütiger Perfusion mit Standardmedium werden markiertes DMO (25 000 counts/min) und Inulin (60 000 counts/min) gleichzeitig aus wässrigen Stammlösungen in das zuströmende Perfusat infundiert. Da Vorversuche gezeigt haben, daß sich in fünf bis acht Minuten die Radioaktivität des venösen Perfusats auf einen konstanten Wert einpendelt, werden nach acht Minuten Proben aus dem abfließenden Perfusat entnommen und danach die Leber nach der Gefrierstopptechnik behandelt (s. II.3.).

Von sauren Extrakten von Perfusat und Gewebe entnimmt man Proben von 100 und 200 μl , die, mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, von einem Packard Trikarb-Flüssigkeits-Szintillationsspektrometer Modell 214 X auf ^{14}C und ^3H über zehn Minuten ausgezählt werden.

Entsprechendes gilt für die Bestimmung des Benzoat-raumes.

Nach Umrechnung auf eine Minute ergibt sich, unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren, eine gewisse Anzahl cpm pro Gramm Extrakt bzw. pro ml Perfusat. Der ^3H -markierte Inulincarboxylat-Raum und der ^{14}C -markierte DMO-Raum (ml pro Gramm perfundiertes Lebergewebe) errechnen sich aus dem Quotienten der markierten Substanzen im Gewebe ($\text{counts} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$) und im Perfusat ($\text{counts} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$) und der Annahme von $f_e/f_i = 1.0$.

Daraus ergibt sich die Berechnung von pH_i :

$$C_z = \frac{C_t - V_e \times C_e}{1 - V_e}$$

daraus errechnet sich:

$$C_{zw} = \frac{C_z \times (1 - V_e)}{V_t - V_e}$$

Wobei:

- C_z : Konzentration von DMO im Zellinnern
($\text{counts} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$)
- C_t : gesamtes in der Leber vorhandenes DMO
($\text{counts} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$)
- C_e : Konzentration von DMO im EZR
($\text{counts} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$)
- C_{zw} : Konzentration von DMO im Zellwasser
($\text{counts} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$)
- V_e : Inulinraum ($\text{ml} \times \text{g}^{-1}$)

V_t : Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht des Gewebspulvers (spez. Gewicht von Wasser 1.0) ($\text{ml} \times \text{g}^{-1}$).

Nach Donnan gilt:

$$\frac{C_{zw}}{C_e} = \frac{\left[\text{H}^+ \right]_{\text{Perfusat}}}{\left[\text{H}^+ \right]_{\text{Zellwasser}}}$$

und nach Definition des pH gilt:

$$\text{pH}_i = \text{pH}_e - \log \frac{\left[\text{H}^+ \right]_{\text{Zellwasser}}}{\left[\text{H}^+ \right]_{\text{Perfusat}}}$$

II. 5. Verwendete Chemikalien und Geräte

Die Enzyme und Natriumpyruvat sind von Boehringer, Mannheim; Hydrazinhydrat und L-Milchsäure wurden von Roth, Karlsruhe, bezogen. Methansulfonsäure stammt von Fluka, Buchs. 5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion (DMO) lieferte Schuchardt, München.

N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-2-äthansulfonsäure (HEPES) und Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) sind von Serva, Heidelberg. Alle übrigen Substanzen stammen von Merck, Darmstadt.

Die photometrischen Tests werden mit einem Hitachi UV-VIS-Spektrophotometer oder einem Photometer Eppendorf (Netheler & Hinz, Hamburg) durchgeführt. Zur pH-Bestimmung verwendet man eine Ingold Ag 7.0 Glaselektrode zusammen mit einem Knick-pH-Meter 291. Die Elektrode wird mit elektro-metrisch standardisierten Eichpufferlösungen von pH 6.0, 7.0 und 9.0 der Fa. Merck eingestellt.

Die O_2 -Konzentration mißt man mit Hilfe einer $20\ \mu$ Platin-Ag-Elektrode, Typ Clark, mit einem $12\ \mu$ dicken Teflonüberzug. Die Signale von pH-Meter und O_2 -Elektrode werden von Kompensations-schreibern RE 541 (Servogor S Metrawatt) aufgezeichnet.

Flüssiger Stickstoff stammt von Fa. Linde, München.

Die Szintillationsflüssigkeit besteht aus 6 g 2-(4-t-butyl-phenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol (Abk.: butyl-PbD) von CIBA, Basel, gelöst in 600 ml Toluol und 400 ml 2-Methoxyäthanol.

Der Gasdurchflußmesser kommt von Fa. Rota.

Die Säuren werden in Form ihrer auf pH 7.2 bis 7.4 neutralisierten Natriumsalze infundiert.

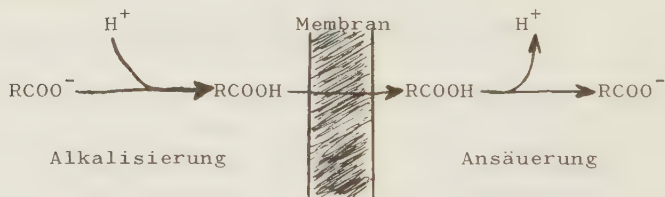
III. Ergebnisse

III. 1. Methode zur Erfassung von Änderungen des intrazellulären pH

III. 1. 1. Theoretische Überlegungen

Der Transport von Kohlendioxid und anderen schwachen Monokarbonsäuren durch die Zellmembran erfolgt als gelöstes Gas bzw. als undissoziierte freie Säure (9 - 11 und 14). Daher ist bei physiologischem pH der Transport schwacher Säuren mit einem entsprechenden Beitrag an H^+ -Ionen verbunden (s. Schema I).

Schema I:



Mitchell hat diesen mit einem Netto- H^+ -Transport gekoppelten Netto-Monokarboxylattransport als "Protonensymport" bezeichnet (15); (formell könnte es sich auch um einen Austausch gegen Hydroxylionen, also um einen "Hydroxylantiport" handeln, der aber mit den gegenwärtigen Methoden nicht zu erfassen ist). Der Raum mit der höheren Konzentration von Monokarbonsäuren wird somit während des Nettoflusses alkalischer, derjenige mit der niedrigeren Konzentration saurer. Die undissoziierte Form liefert keinen wesentlichen Beitrag bei der Substrataufnahme, da die untersuchten Substanzen einen pK_a unter 6.1 aufweisen und im untersuchten pH-Bereich von 7.1 bis 7.5 weitgehend dissoziiert sind.

Siesjö konnte am Rattenhirn nachweisen, daß die Zellmembran für Bikarbonat und H^+ -Ionen offensichtlich impermeabel ist (16). Auch das negative Membranpotential im Zellinnern verhindert die Anionenaufnahme. Ein Transport von Anionen anstatt von Säuren ist an die Existenz spezieller Transportsysteme (Translokatoren) gebunden. Auch bei anderen Systemen wurde mit unterschiedlicher Methodik ein passiver Transport von organischen und anorganischen Säuren gezeigt (15,18, 19,22,50). Somit kann man durch die Aufzeichnung des extrazellulären pH die Netto- H^+ -Ionenbewegungen messen und Rückschlüsse auf die begleitenden Monokarboxylatflüsse ziehen.

III. 1. 2. H^+ -Ionenbewegungen bei der Äquilibration von Monokarboxylatgradienten zwischen Extra- und Intrazellulärraum der hämoglobinfrei perfundierten Leber

Die Fig. 1 zeigt einen Versuch, in welchem der pH-Wert im abfließenden Perfusat kontinuierlich registriert wird: zu Beginn ist er konstant auf 7.41; nun wird fünf Minuten lang Benzoat und etwas später für vier Minuten Oktanoat in das zufließende Perfusat gegeben. Dieser sprunghafte Anstieg in der Monokarboxylatkonzentration ist begleitet von einer vorübergehenden Erhöhung des pH im venösen Perfusat, bis sich der pH auf einem neuen stationären Zustand einpendelt. Die pH-Veränderungen sofort nach Beendigung der Monokarboxylatinfusion zeigen, daß dieser Effekt voll reversibel ist.

Bei Oktanoat kann man in Fig. 1 außerdem den oxidativen Abbau mit der Bildung saurer Äquivalente verfolgen, da sich der pH-Wert im abfließenden Medium auf einem niedrigeren Wert einpendelt.

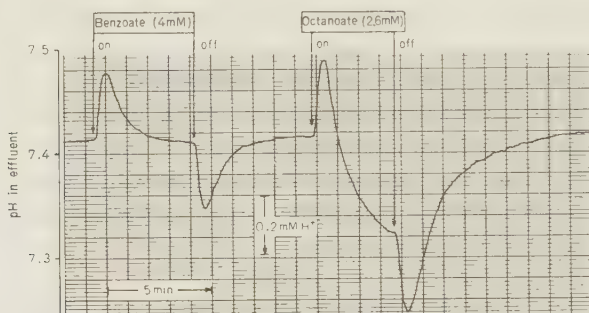


Fig. 1

Die pH-Änderung im abfließenden Perfusat bei Zugabe von neutralisierter Benzoat- bzw. Oktanoatlösung bei der hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber. Beide Natriumsalze werden in Konzentrationen von 4 mM bzw. 2.6 mM für den oben angegebenen Zeitraum zugesetzt.

Demgegenüber kann man bei der Infusion von Benzoat, das vergleichsweise stoffwechsellinert ist, keine Veränderungen dieser Art feststellen. Hier ist die Menge der abgegebenen H⁺-Ionen praktisch gleich der Menge der aufgenommenen. Es wird der pH-Wert vor Beginn der Benzoatinfusion erreicht.

Ein weiterer Hinweis für fehlende metabolische Effekte ist der konstant bleibende Sauerstoffverbrauch; bei der Oktanoatinfusion steigt er dagegen an. Wegen dieser Stoffwechselinearität, wegen seiner vergleichsweise großen pH-Effekte und wegen seiner guten Absorption bei 273 nm wird Benzoat in den folgenden Versuchen als "Modell-Monokarboxylat" benutzt.

Die Netto- H^+ -Ionenaufnahme errechnet sich aus der Auslenkung der Kurve des extrazellulären pH durch graphische Integration (siehe Methodik).

Die zunehmende Abflachung der Kurve zeigt, daß sich zwischen Zellinnen- und Zellaußenmembran ein Permeationsgleichgewicht ausbildet und der Nettofluß sistiert.

Nach Infusionsstopp ("off-Effekt") kehrt sich der Konzentrationsgradient um, und es kommt entsprechend dem Fickschen Gesetz zu einem Monokarboxylatausstrom aus der Zelle, begleitet von einem vorübergehenden pH-Abfall.

Man kann in dieser Art verschiedene Monokarboxylate in verschiedenen Konzentrationen hinzugeben und erhält folgendes Ergebnis: die pH-Veränderungen stehen in einer linearen Beziehung zur Konzentration der zugesetzten Monokarboxylate (12, 25); und zwar sowohl betreffs der Höhe, die proportional zur maximalen Aufnahme rate ist, als auch der Fläche unter der pH-Kurve, die proportional zur Protonenaufnahme oder -abgabe ist (Fig. 2).

Bei den aromatischen Monokarboxylaten (z. B. Benzoat und Salizylat) ist die H^+ -Aufnahme um rund das doppelte bis dreifache höher als bei den aliphatischen (z. B. Azetat, Chlorazetat, Propionat und Isobutyrat). Bei aliphatischen Monokarbonsäuren

mit einer Kettenlänge von C_1 bis C_4 finden sich keine signifikanten Unterschiede: Azetat $0.63 \pm 0.07 \mu \text{mol H}^+ (\text{g Leber})^{-1}$ ($n=10$), Chlorazetat 0.716 ± 0.061 ($n=8$), Propionat 0.795 ± 0.05 ($n=4$) und Isobutyrat 0.689 ± 0.044 ($n=5$), jeweils bei 10 mM im zufließenden Perfusat. Bei aromatischen Monokarbonsäuren ergeben sich für Benzoat 1.62 ± 0.11 ($n=11$) und für Salicylat 1.85 ± 0.25 ($n=9$).

Die kleinen Unterschiede in den Meßwerten erklären sich aus der unterschiedlichen Effektivität der Perfusion und aus der biologischen Varianz der Rattenleber.

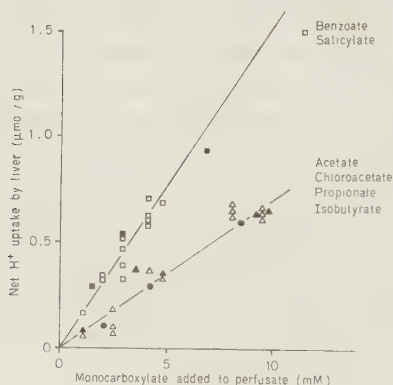


Fig. 2

Beziehung zwischen der Netto- H^+ -Ionenaufnahme durch die Leber und der Monokarboxylatkonzentration im zufließenden Perfusat. Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier aliphatischen und den zwei aromatischen Säuren. Die Linien beziehen sich auf Benzoat und Azetat.

Eine Arbeit von Spencer et al. (23) bringt eine Übereinstimmung hiermit: mit steigendem extrazellulären pH sank die maximale Laktataufnahme bei Ascitestumorzellen; bei sinkendem extrazellulären pH kam es zu einem Anstieg des Laktatgehalts; bei Laktateintritt in die Zellen sank der intrazelluläre pH.

Bei Hinzugabe aliphatischer oder aromatischer Dikarboxylate, z. B. Succinat oder Phthalat zum Perfusat erfolgt keine Veränderung in der pH-Registrierung. Dies steht in Einklang damit, daß Dikarboxylate weitgehend impermeabel sind (12).

Ein ähnliche Ergebnis wird mit Cholin erzielt, das in Form seines Chlorids in das Perfusat gegeben wird; dieses impermeable Kation ergibt keine pH-Veränderungen.

Demgegenüber führen Basen wie Methyl- und Dimethylammoniumchlorid zu pH-Veränderungen, die sich gerade entgegengesetzt zu den mit schwachen Säuren erzielten Veränderungen verhalten: bei Infusionsbeginn kommt es zum pH-Abfall; das bedeutet einen Austausch der schwachen Basen gegen H^+ -Ionen. Die quantitativen Effekte sind dabei weitaus größer als bei den hier untersuchten Monokarboxylaten.

III. 1. 3. H^+ -Ionenbewegungen bei der Äquilibrierung von DMO- und CO_2 -Gradienten

Untersucht wird das Verhalten der schwachen Säure DMO (5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion). In III. 2. wird diese Substanz verwendet bei der Bestimmung des intrazellulären pH nach der Methode von Waddell und Butler (20). In der Fig. 3 ist die H^+ -Ionen-Aufnahme oder -Abgabe beim Ausgleich eines DMO-Gradienten dargestellt. DMO verhält sich im Hinblick auf die Netto-Protonenbewegung wie eine aliphatische Monokarbonsäure (s. auch Tab. III). Der passive Transport von DMO wurde von Addanki et al. (29) beobachtet. Das zeigt die Brauchbarkeit dieser Substanz zur Bestimmung des pH_i .

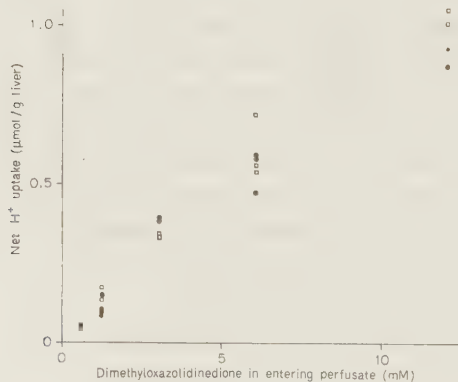


Fig. 3

Beziehung zwischen der Netto- H^+ -Ionenaufnahme durch die Leberzelle und der Dimethyloxazolidindion-Konzentration im Perfusat.

Die Kohlensäure zeigt das gleiche Verhalten wie die anderen Monokarbonsäuren. Mit zwei Oxygenatorsystemen von unterschiedlichen Gasmischungen durchströmt und zwei Perfusionsmedien "10% CO₂"



Fig. 4

Benzoatveränderungen (Fig. 4 A) und pH-Veränderungen (Fig. 4 B) im abfließenden Perfusat beim Wechsel von "2.5% CO₂" auf "10% CO₂" bzw. von "10% CO₂" auf "2.5% CO₂". Im zufließenden Perfusat liegt Benzoat in einer Konzentration von 1.5 mM vor.

und "2.5% CO₂" soll das dargestellt werden (Fig. 4 B). Bei diesem Experiment wird die Leber anfangs mit "2.5% CO₂"-Medium perfundiert, dann wird auf "10% CO₂"-Medium umgeschaltet und schließlich wieder auf das Ausgangsmedium zurückgekehrt. Ähnlich den Ergebnissen bei den oben dargestellten Monokarboxylaten erfolgt beim Übergang von der relativ niedrigeren zur höheren CO₂-Konzentration eine vorübergehende pH-Erhöhung im abfließenden Perfusat. Folglich läßt sich Schema I und die neue Methode auch auf das CO₂/HCO₃⁻-System anwenden.

III. 2. H⁺-Ionenbewegungen bei Monokarboxylat- äquilibrierung in unterschiedlichem Kohlen- dioxidmilieu

Der pK_a von H₂CO₃/CO₂ ist mit 6.1 um rund zwei Einheiten höher als die pK-Werte anderer Monokarboxylate (ausgenommen DMO mit pK_a von 6.13). Deshalb kann die Pufferkapazität der getesteten Monokarboxylate im physiologischen pH-Bereich vernachlässigt werden. Aufgrund dieser höheren Pufferkapazität sollte eine Änderung in der Kohlendioxid-Konzentration nicht nur die in Fig. 4 B gezeigte vorübergehende Änderung im intrazellulären pH-Wert zur Folge haben, sondern der pH_i sollte sich auf einen neuen stationären Zustand einpendeln.

Entsprechend der Donnan-Beziehung (24)

$$\frac{[H^+]_i}{[H^+]_e} = \frac{f_e \times [RCOO^-]_e}{f_i \times [RCOO^-]_i} \quad (I)$$

f: Aktivitätskoeffizient des Anions,

zieht eine Veränderung des intrazellulären pH eine Änderung des Monokarboxylat-Gradienten über der Zellmembran nach sich. Bei konstantem extrazellulären pH und konstanter extrazellulärer Monokarboxylatkonzentration gilt mit $f_e/f_i = 1$:

$$\Delta pH_i = \Delta \log [RCOO^-]_i \quad (II)$$

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die mit dem Monokarboxylatdurchtritt gekoppelte Netto- H^+ -Ionen-Bewegung der Konzentration des permeierenden Monokarboxylats proportional ist, gilt weiterhin:

$$\Delta pH_i = \Delta \log \{ \text{Netto-}H^+\text{-Transport} \} \quad (IIa)$$

bezogen auf Mol/g Lebergewebe.

Da nach allgemeiner Übereinstimmung das Bikarbonat-Anion nicht in die Leberzelle eindringt (16, 30), wogegen CO_2 leicht permeiert, interessiert das Verhalten der benzoatgekoppelten Protonenbewegungen bei verschiedenen genau definierten CO_2 -Spannungen im zufließenden Perfusat, zur Beantwortung der Frage nach dem Einfluß der extrazellulären CO_2 -Konzentration auf den intrazellulären pH.

In Fig. 5 infundiert man Natriumbenzoat in einer Endkonzentration von jeweils 3.1 mM; und zwar

nachdem sich das Perfusionssystem einmal mit dem "10% CO₂"-, das andere Mal mit dem "2.5% CO₂"-Medium ins Gleichgewicht gesetzt hat. Um die beiden Versuchsabschnitte besser vergleichen zu können, wird der pH des zufließenden Perfusats in beiden Fällen auf den gleichen Wert gebracht durch entsprechenden Austausch des Chlorids gegen Bikarbonat (s. Tab. I). Man kann deshalb die Ionenstärke in allen zwei Zuständen als gleich ansehen.

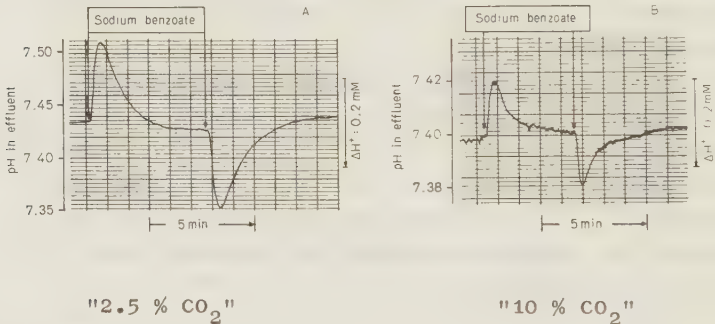


Fig. 5

Netto-H⁺-Ionenbewegung beim Durchtritt von Benzoat durch die Zellmembran bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen. Das auf pH 7.4 neutralisierte Natriumsalz der Benzoesäure wird in einer Endkonzentration von 3.1 mM während der markierten Zeiträume infundiert. Im Perfusionssystem fließt einmal "2.5% CO₂"-später "10% CO₂"-Medium. Der stationäre Zustand dem der pH-Wert im abfließenden Perfusat zustrebt ist in beiden Fällen praktisch identisch.

Die Fig. 5 zeigt, daß die beobachteten pH-Änderungen nach sprunghafter Zunahme der Benzoatkonzentration von der CO_2 -Konzentration im Perfusat abhängen. Entsprechend der unterschiedlichen intrazellulären CO_2 -Konzentration ist die Netto- H^+ -Ionenaufnahme durch die Leberzellen bei "2.5% CO_2 "-Perfusionsmedium (Fig. 5 A) um rund das Doppelte höher als beim "10% CO_2 "-Perfusionsmedium (Fig. 5 B). Mit Hilfe einer Eichkurve wird die H^+ -Aufnahme pro Gramm Feuchtgewicht und pro Minute berechnet: bei einer CO_2 -Erhöhung von 0.6 auf 2.4 mM sinkt die Aufnahme von 1.3 auf 0.6 $\mu\text{Mole x (g Leber)}^{-1}$.

Unter der Annahme, daß der den Anionen zur Verfügung stehende intrazelluläre Lösungsraum in beiden Versuchsbedingungen konstant bleibt, errechnet sich in Übereinstimmung mit Gleichung (II a) ein Abfall des intrazellulären pH-Werts im Fall von "10% CO_2 " um 0.3 Einheiten ($\log 1.3/0.6 = 0.34$).

Um den Beweis für die Brauchbarkeit der hier zur Debatte stehenden Methode zur pH_i -Bestimmung zu liefern, wird für die beiden Versuchsbedingungen, die Fig. 5 zeigt, der intrazelluläre Gesamt-pH-Wert mit einer Methode bestimmt, die von Waddell und Butler (20) entwickelt wurde (s. Methodik). Die Werte, die sich aus der Verteilung von ^{14}C -markiertem Dimethyloxazolidindion errechnen sind in Tab. II dargestellt.

Tab. 2

Intrazellulärer pH bestimmt aus der Verteilung von Dimethyloxazolidindion zwischen dem Intrazellulärraum und dem Perfusat unter Verwendung von "2.5% CO₂"- und "10% CO₂"-Medium bei nahezu gleichem extrazellulären pH.

Näheres siehe unter Methodik. Zahlen unter Angabe von $\pm$ S.E.M. In Klammern die Anzahl der Messungen.

Perfusions- flüssigkeit	Perfusat-pH	intrazellulärer pH
"2.5% CO ₂ "	7.33 $\pm$ 0.02 (5)	7.25 $\pm$ 0.10 (5)
"10% CO ₂ "	7.30 $\pm$ 0.01 (7)	7.06 $\pm$ 0.08 (7)

Da nur der Unterschied von pH_e zu pH_i und die Änderung von pH_i interessieren, erübrigen sich die absoluten Werte im Perfusat oder im Gewebe. Der pH_i, der mit dieser Methode gewonnen wird, sinkt, wenn die CO₂-Konzentration steigt; und zwar von 7.25 im Versuchsteil "2.5 % CO₂" auf 7.06 im Versuchsteil "10 % CO₂", bei fast gleichen Werten für den extrazellulären pH.

III. 3. H^+ -Ionenbewegungen bei Monokarboxylat-äquilibriumierung bei Anwesenheit nichtflüchtiger Puffer.

Wenn man Kohlendioxid völlig durch nichtflüchtige Puffersysteme ersetzt, hängt die Höhe der Netto- H^+ -Ionenaufnahme der Leberzellen beim Ausgleich eines Monokarboxylatgradienten von dem jeweils verwendeten Puffer ab.

In der Tab. 3 findet sich eine Zusammenstellung der Daten, die man mit zwei zwitterionischen Puffern (HEPES und MOPS) und mit DMO bei gleicher Pufferkapazität erhält. (Zusammensetzung siehe Tab. 1). In diesen Versuchen ist kein CO_2 im zuströmenden Perfusat, sondern 100 % Sauerstoff. Die Netto- H^+ -Ionenaufnahme durch die Leber ist bei HEPES und MOPS höher als bei DMO. Dieses Ergebnis führt zu dem Schluß, daß bei den weniger permeablen zwitterionischen Puffern der intrazelluläre pH-Wert im Vergleich zu den permeablen Puffern DMO oder CO_2 höher liegt.

Das nichtflüchtige DMO ist - im Hinblick auf den pH_i - ein besserer Ersatz für den Bikarbonatpuffer als die zwitterionischen nichtflüchtigen Puffer.

Bei einer anderen Monokarbonsäure, die sich ähnlich wie Azetat, Benzoat und DMO verhält, soll die Konzentrationsabhängigkeit der Netto- H^+ -Ionenaufnahme in Anwesenheit eines zwitterionischen Puffers dargestellt werden. Fig. 6 zeigt H^+ -Ionenbewegungen, die beim Durchtritt von Pyruvat durch die Zellmembran auftreten. Es sind die Netto- H^+ -Aufnahme oder -Abgabe bei "10% CO_2 "-Medium und MOPS-Medium aufgetragen. Im MOPS-Medium

ist die Netto- H^+ -Aufnahme höher als im "10% CO_2 "-Medium, gleiche Konzentrationen an Pyruvat im zufließenden Perfusat vorausgesetzt. Ansonsten ergibt sich eine praktisch proportionale Abhängigkeit der Netto- H^+ -Ionenaufnahme von der Pyruvatkonzentration.

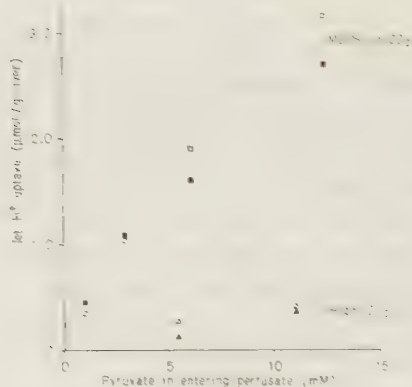


Fig. 6

Abhängigkeit der Netto- H^+ -Ionenaufnahme durch die Leber von der Pyruvatkonzentration im zufließenden Perfusat bei "10% CO_2 " und bei fehlendem CO_2 im Perfusat; statt dessen wird MOPS (7.4 mM) als Puffersystem verwendet. Die schwarzen und weißen Symbole beziehen sich auf "an"- und "aus"-Effekte.

Tab. 3

Auswirkungen beim Wechsel des Puffersystems in der Perfusionsflüssigkeit auf die Netto- H^+ -Ionenaufnahme, die den Durchtritt schwacher Säuren durch die Leberzellmembran begleitet.

Zusammensetzung der Perfusionsflüssigkeit siehe Tab. 1.

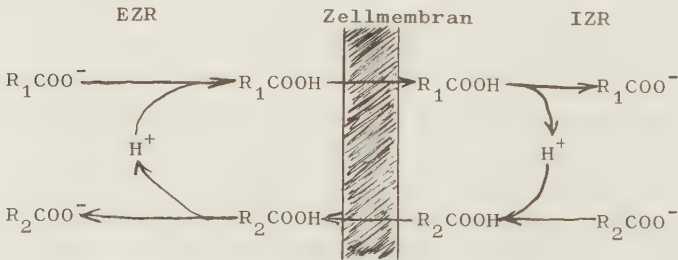
$\Delta pH / \Delta [H^+]$ wird mit einer Eichkurve bestimmt. Zahlen unter Angabe von $\pm$ S.E.M. Anzahl der Messungen in Klammern.

Perfusions- flüssigkeit	Netto- H^+ -Aufnahme durch die Leber bei Zu- gabe von 10 mM des Natriumsalzes der schwachen Säure in $\mu\text{mol} \times (\text{g Leber})^{-1}$.		
	Azetat	Benzoat	DMO
"10% CO_2 "	0.41	1.06 ± 0.2 (n = 7)	0.37 ± 0.03 (n = 7)
Standard	0.71 ± 0.04 (n = 10)	1.62 ± 0.11 (n = 11)	0.82 ± 0.04 (n = 8)
"2.5% CO_2 "	0.96	2.00	1.20 ± 0.07 (n = 11)
Kein CO_2 :			
DMO	1.05 ± 0.03 (n = 3)	2.38 ± 0.12 (n = 3)	
HEPES	1.45 ± 0.14 (n = 21)	4.098 ± 0.22 (n = 8)	
MOPS	1.47	4.16 ± 0.00 (n = 2)	1.91 ± 0.12 (n = 11)

III. 4. Abhängigkeit der intrazellulären Monokarboxylat-Konzentration von der CO_2 -Konzentration außerhalb der Zelle

Es wurde gezeigt, daß einer Konzentrationserhöhung der Monokarbonsäuren im zufließenden Perfusat eine intrazelluläre pH-Erniedrigung folgt (Schema I). Gleichzeitig damit beeinflussen weitere Translokationsprozesse die Höhe des pH_i : vom direkten Austausch von H^+ -Ionen gegen Kationen (z. B. H^+/K^+) abgesehen, auch der Austausch von Monokarboxylaten gegen Anionen an der Zellmembran. Der Netto- H^+ -Iontentransport beim Ausgleich eines Monokarboxylatgradienten ist dadurch verringert, weil er in die entgegengesetzte Richtung erfolgt wie in Schema I.

Es soll hier der Austausch von Anionen (speziell Monokarboxylaten) gegen Monokarboxylate betrachtet werden (s. Schema II):



Bei Zugabe eines Monokarboxylats R_1COO^- zum arteriellen Perfusat erscheint beim Ausgleich von Konzentrationsunterschieden das ursprünglich im Intrazellulärraum gelöste Monokarboxylat R_2COO^- im Extrazellulärraum.

In den vorliegenden Versuchen werden die Zellen zuerst mit Monokarboxylaten, wie Laktat, Pyruvat oder Benzoat "aufgeladen". Registriert wird dann die Konzentrationsänderung dieser Stoffe im venösen Perfusat bei Zugabe anderer schwacher Monokarboxylate wie CO_2 oder Azetat.

In Fig. 4 A sieht man den Übergang von "2.5 % CO_2 "- auf "10 % CO_2 "-Medium und die damit verbundene Ausschwemmung von Benzoat aus den Leberzellen; umgekehrt kommt es beim Austritt der Kohlensäure aus der Zelle zur Einschleusung von Benzoesäure.

In diesem Versuch beträgt die Ausschwemmung $0.8 \mu\text{mol Benzoat} \times (\text{g Leber})^{-1}$ und die Aufnahme $1.0 \mu\text{mol Benzoat} \times (\text{g Leber})^{-1}$.

Untersucht man die Benzoataufnahme durch die Zelle bei verschiedenen Benzoatkonzentrationen im arteriellen Perfusat während des Wechsels von "2.5 % CO_2 "- zum "10 % CO_2 "-Medium und umgekehrt, so ergibt sich eine proportionale Abhängigkeit von der Benzoatkonzentration; bei höheren Werten strebt sie einem Sättigungswert zu.

Beim Übergang von "2.5% CO_2 "- auf "10% CO_2 "- Medium werden auch Laktat und Pyruvat aus der Zelle transportiert (Fig. 7). In kurzen Zeitabständen werden Proben aus dem venösen Perfusat entnommen und auf ihren Gehalt an Pyruvat und Laktat untersucht. Laktat und Pyruvat sind hier in Endkonzentrationen von 2.0 bzw. 0.3 mM ins arterielle Perfusat zugegeben worden. Die Äquilibrierungsvorgänge sind in weniger als einer Minute abgeschlossen. Danach kehrt der Laktatspiegel wieder auf seinen ursprünglichen Wert zurück; der Pyruvat-

spiegel pendelt sich auf einem höheren Niveau ein. Folglich sinkt der Laktat/Pyruvat-Quotient ab. Entsprechend verhält sich auch die pyridinnucleotid-spezifische Oberflächenfluoreszenz; es ergibt sich somit eine vorübergehende Änderung im zytosolischen NADH/NAD⁺-System (31).

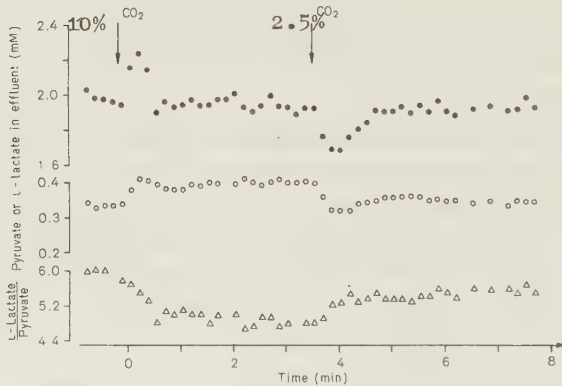


Fig. 7

Aufnahme von oder Abgabe aus der Leber bei Pyruvat (○) und Laktat (●) beim Wechsel vom "2.5% CO₂"- auf "10% CO₂"- und vom "10% CO₂"- auf "2.5% CO₂"-Medium. Außerdem ist der Quotient Laktat/Pyruvat dargestellt.

III. 5. Monokarboxylat-Monokarboxylat-Austausch bei verschiedenen CO₂-Zuständen

Die unterschiedliche Ausschwemmung von Benzoat aus den Leberzellen auf Monokarboxylatzugabe bei verschiedenen CO₂-Konzentrationen im Extrazellulärraum ist ein Hinweis für den unterschiedlichen intrazellulären pH in beiden Fällen. Bei Zugabe von 10 mM Azetat kommt es zu einer Abgabe von Benzoat (obere Kurve in Fig. 8) und zu einer entsprechenden Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes (untere Kurve). Diese Benzoat-Abgabe und H⁺-Ionenaufnahme durch die Leberzellen ist im Falle von "2.5% CO₂" als Puffermedium höher als im Falle von "10% CO₂". Der Effekt ist beim Stopp der Azetatinfusion reversibel.

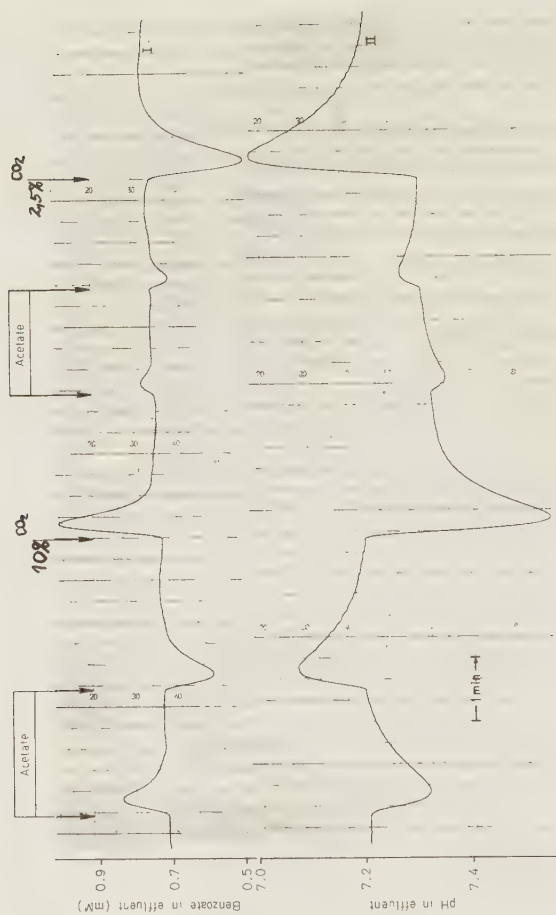


Fig. 8

Änderung der Benzoat- bzw. H⁺-Ionen-Konzentration im abfließenden Perfusat bei Zugabe von Natriumazetat in einer Endkonzentration von 10 mM zum "10% CO₂"- bzw. zum "2.5% CO₂"-Medium.

IV. Diskussion

IV. 1. "Intrazellulärer pH-Wert"

Der intrazelluläre pH ist eine komplexe Größe, da intrazelluläre Kompartimente wie beispielsweise Mitochondrien, Kern, Lysosomen einen unterschiedlichen pH aufweisen. Trotzdem hat sich die Verwendung dieses Begriffs für eine Reihe von Fragestellungen als nützlich erwiesen, wie auch die vorliegende Arbeit zeigt. In vielen Geweben ist der intrazelluläre pH niedriger als der pH_e ; zudem bestehen organbedingte Unterschiede, so beträgt er in der Nierentubuluszelle 7.32 und an der Skelettmuskelzelle 7.17 bei einem extrazellulären pH von jeweils 7.40 (32,33).

Zur Bestimmung des Δ pH zwischen intra- und extrazellulärem Raum wird die Verteilung einer schwachen Säure zwischen IZR und EZR benutzt. Dazu wird die Substanz DMO verwendet, die nach Waddell und Butler (20) ideal für die pH_i -Bestimmung ist, da (a) die Konzentration (Aktivität) der ungeladenen Form zu beiden Seiten der Membran gleich ist; (b) die Transportrate des DMO-Anions im Vergleich zur ungeladenen Säure gering ist; (c) DMO metabolisch inert ist und keine Stoffwechselprozesse beeinflusst; (d) die DMO-Verteilung nicht vom Membranpotential beeinflusst wird; (e) der pK_a von DMO im IZR und EZR gleich ist und (f) DMO sich in der wässrigen Phase konzentriert und sich nicht an Zellbestandteile bindet.

Die Höhe des pH_i hängt von der Bestimmungsmethode ab (16, 34). Bei Verwendung von DMO beträgt der pH in der Skelettmuskelzelle 7.17, aber 6.69 bei Messung mit der schwachen Base Nikotin (33). Ähnlich bei (35).

Hannan und Wiggins erzielten am *M. sartorius* des Frosches mit vier Methoden vier unterschiedliche Ergebnisse (36). Die Differenzen erklären sich, wie oben angedeutet, mit der Inhomogenität des Zellinnern. In den alkalischen Kompartimenten konzentriert sich vorzugsweise die Säure DMO, in den saureren die Base Nikotin. Mit der Base Methylamin wurde der pH in Lysosomen bestimmt (35).

Durch die Kompartimentierung des Zellinnern bleibt die Annahme eines pH_i eine Abstraktion.

In dieser Arbeit interessiert aber nicht so sehr der absolute Wert, sondern die Veränderungen des intrazellulären pH-Werts.

Williams und Woodbury kamen an der intakten Rattenleber mit der DMO-Methode auf einen pH_i von 7.25 (37), Friedmann fand an der perfundierten Leber einen pH_i von 7.28 (38); beides Werte, die fast denjenigen entsprechen, die hier mit der gleichen Methode an der perfundierten Rattenleber ermittelt werden (s. Tab. 2).

Thomas und Johnson (30) entwickelten eine andere Methode zur direkten Berechnung von pH_i -Veränderungen in submitochondrialen Teilen: sie ersetzten endogenes Cytochrom C durch pH-sensitive fluoreszierende Derivate und maßen einen transmembranalen pH-Gradienten von weniger als 0.2 Einheiten beim Rinderherz.

Es ist zu bedenken, daß diese absoluten Zahlen wegen des intrazellulären Aktivitätskoeffizienten von DMO noch einer Korrektur unterliegen. So werden z. B. die Werte, die man für die Azetatverteilung von Mitochondrien erarbeitet hat, um 0.3 pH-Einheiten kleiner, wenn man sie um den Aktivitätskoeffizienten für Azetat (0.5) in der intramitochondrialen Phase berichtigt (22).

IV. 2. Kohlendioxidkonzentration und intrazellulärer pH

CO₂ beeinflußt über den pH Zellfunktionen (vgl. Einleitung).

Die Ergebnisse aus Fig. 5 zeigen, daß in einem iso-pH-System die monokarboxylatabhängige H⁺-Ionenbewegung zur CO₂-Konzentration in einer reziproken Abhängigkeit steht. Die Abnahme des intrazellulären pH bei steigender CO₂-Konzentration erklärt die sich ergebende verminderte Monokarboxylataufnahme durch die Zelle. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch die davon unabhängige Messung des pH_i mit der DMO-Methode. In der perfundierten Rattenleber hängt die intrazelluläre H⁺-Ionenkonzentration von der extrazellulären CO₂-Konzentration ab im Einklang mit der Gibbs-Donnan-Beziehung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Gegensatz zu einer Veröffentlichung von Longmore (40), der beobachtete, daß der pH_i konstant bleibt, wenn man die gesamte extrazelluläre CO₂-Konzentration zwischen 8 und 40 mM variiert. Auch er führte seine Arbeiten an der perfundier-

ten Leber in einem iso-pH-System durch und folgerte, daß Leberzellen, im Gegensatz zu Schema I, auch für das Bikarbonat-Anion permeabel seien. Da sich jedoch die Folgerungen in der zitierten Arbeit nur auf zwei Experimente stützen, mag die Unstimmigkeit nicht systematischer Natur sein.

Auch in Chloroplasten erfolgt die CO_2 -Aufnahme durch Diffusion (41) und es gibt keine Anzeichen für einen spezifischen Bikarbonat-Transport.

Thomas (42) beobachtete bei Zugabe von CO_2 ein starkes und schnelles Absinken des pH_i . Die Wirkung der CO_2 -Konzentration auf den intrazellulären pH wurde bei einer Vielzahl anderer Systeme demonstriert, so bei isolierten Rattenleberzellen (Pfaff E., Baur H., Sies H., unveröffentlicht), beim Hundeskelettmuskel (20), bei Aszites-Tumorzellen (21), Sepianerven u. a. (s. Übersicht (43)).

IV. 3. Intrazellulärer pH-Wert bei permeablen und nicht permeablen Puffersystemen

Der Großteil des pH-Gradienten wird nicht durch aktive Prozesse aufrechterhalten, sondern durch passive Eigenschaften der Zelle. Bei einem in extrem sauren Milieu lebenden Mycoplasma untersuchten Hsung und Haug (44) den pH_i und hielten ein Donnan-Gleichgewicht über der Membran, das verursacht wird durch ein intrazelluläres Makromolekül, welches impermeabel ist, für verantwortlich für den riesigen pH-Gradienten.

In dieser Arbeit werden einerseits DMO, andererseits HEPES und MOPS als permeable bzw. nicht permeable Puffersysteme benützt. Nach Tab. 3 ist die Netto- H^+ -Aufnahme bei Zugabe von Monokarboxylaten unter Verwendung von HEPES oder MOPS als Puffersystem höher als mit DMO als Puffersystem: zum Vergleich beträgt die Netto- H^+ -Aufnahme bei Zugabe von 10 mM Benzoat $2.38 \mu\text{mol (g Leber)}^{-1}$ bzw. 4.10 und $4.16 \mu\text{mol (g Leber)}^{-1}$. Dieses Ergebnis zeigt, daß in Gegenwart von HEPES und MOPS als Puffersystem der intrazelluläre pH-Wert alkalischer ist. Für eine bestimmte Pufferkapazität ist die Pufferkonzentration in den Zellorganellen bei polareren Puffern, wie den zwitterionischen HEPES und MOPS geringer, als bei weniger polaren (Good et al. (45)).

(Mangels des erforderlichen radioaktiv markierten Materials sind die Permeabilitätsverhältnisse dieser Moleküle an der Leberzelle noch nicht genügend erforscht; deshalb soll "nicht-permeabel" in diesem Zusammenhang bedeuten: eine geringe Permeabilität im Vergleich zu DMO oder CO_2 .)

Obgleich in dieser Arbeit die H^+ -Ionenaufnahme unter Verwendung von DMO als Puffersystem etwas höher ist als jene, die mit $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ - bei ähnlicher Pufferkapazität - erzielt wird, gleicht DMO hinsichtlich des intrazellulären pH-Werts mehr dem Bikarbonatpuffer als den Good-Puffern. Auch bei Werdans Chloroplastenversuchen (41) sind die DMO- und die Bikarbonat-ergebnisse praktisch identisch.

Wenn man experimentelle Ergebnisse zwischen verschiedenen Puffersystemen miteinander vergleicht, so ist zu beachten, daß - abgesehen von der unwesentlichen unterschiedlichen Pufferkapazität - ihre Auswirkungen auf den intrazellulären pH-Wert berücksichtigt werden müssen (46). Der pH_i ist nicht nur eine Funktion des pH_e (33), sondern auch vom benutzten Puffersystem abhängig. Der Einfluß des extrazellulären pH auf die intrazellulären Stoffwechselreaktionen ist ganz unterschiedlich, je nach Auswirkung des Puffersystems auf den pH_i .

In fibroblastoiden Zellkulturen kommt es bei Verminderung von Bikarbonat von 44 mM auf 6 mM und Zugabe von 30 mM HEPES zum Kulturmedium zu einer reversiblen Abnahme des Membranpotentials von rund 20 mV im Sinn einer Depolarisation (47). Die Permeabilität der für die Entstehung des Membranpotentials verantwortlichen K^+ - und Na^+ -Ionen wird also durch intrazelluläre pH-Veränderungen beeinflusst. Den Einfluß des pH_i auf die Kalziumsensitivität der Herzmuselfaser zeigt Donaldson (48).

Einen Einfluß des jeweils verwendeten Puffersystems auf den Na^+/H^+ -Austausch an Nierenrindenschnitten vom Kaninchen konnte Nielsen (46) feststellen. Er ersetzte den Bikarbonatpuffer durch äquimolaren Tris-TES-Puffer und beobachtete einen Anstieg des intrazellulären pH von 6.5 auf 6.9 gemessen mit der DMO-Methode. Seine Ergebnisse interpretierte er nach Schema I.

IV. 4. Unterschiede zwischen aliphatischen und aromatischen Monokarboxylaten bezüglich der Translokation

Die Aufnahme aromatischer Monokarboxylate ist zwei- bis dreimal höher als die der aliphatischen Monokarboxylate (siehe Fig. 2). Diese Unterschiede erklären sich mit den chemischen und physikalischen Eigenschaften der Substanzen, insbesondere der Molekülgröße, den substituierten Gruppen und des pK_a ; sie wirken sich auf den Lösungsraum des Monokarboxylats in der Leberzelle aus.

Auch werden die aromatischen Monokarboxylate an der Lipid-Wasser-Grenzfläche besser absorbiert bzw. gelöst. Daß Unterschiede in der Lipidlöslichkeit die Penetrationsrate beeinflussen, konnte Green an roten Blutkörperchen zeigen (49). Lipidreiches Lebergewebe sollte einen deutlicheren Unterschied zwischen der Aufnahme von aromatischen und kurzkettigen aliphatischen Säuren zeigen. In dieser Arbeit interessiert aber hauptsächlich die Proportionalität zwischen Monokarboxylat- und H^+ -Ionenaufnahme und weniger die unterschiedliche Steigung.

IV. 5. Transportmechanismus von Bikarbonat und anderen Monokarboxylaten an der Zellmembran

Die Aufnahme von Monokarbonsäuren an der Zellmembran erfolgt nach Schema I. Die Versuchsergebnisse zeigen, daß der Netto- H^+ -Ionen-Transport für metabolisch aktive Säuren, wie Azetat und inaktive schwache Säuren, wie Chlorazetat oder DMO bei kleinen Konzentrationen,

wo die Pufferkapazität zu vernachlässigen ist, ungefähr gleich ist (Fig. 2 und 3).

Die pyruvatbedingte H^+ -Aufnahme ist unter normoxischen und anoxischen Bedingungen ziemlich ähnlich (12).

Bei einem pH_i , der größer ist als der pH_e kommt es zu einer Laktat-Akkumulation in der Zelle; die Laktatverteilung ist eine Funktion des pH-Gradienten und unabhängig von metabolischer Energie (51).

Andererseits ist in Rattenlebermitochondrien und menschlichen Erythrozyten ein spez. Inhibitor des Pyruvattransports gefunden worden (alpha-Cyano-4-hydroxycinnamat) (52).

Dikarboxylate zeigen in den vorliegenden Versuchen keine Netto- H^+ -Aufnahme. Auch Oldendorf maß an Di- und Trikarboxylaten eine Aufnahme von nahezu null (53). Die Gründe liegen in der niedrigeren Dissoziationskonstante (Größenordnung 10^{-5} bis 10^{-6}) und an einem anderen Transportweg: bei Erythrozyten wandern Di-karboxylate nicht wie Monokarboxylate durch die Lipoidphase, sondern hauptsächlich durch hydrophile Kanäle von ca. 40 nm Durchmesser (54). Bei diesen Poren handelt es sich um Proteineinschlüsse, die eine ähnliche dielektrische Konstante wie die umgebende Elektrolytlösung besitzen und so den Transport der Ionen ermöglichen (55).

IV. 6. Einfluß anderer Translokationsprozesse
auf die gekoppelte Protonen-Monokarboxylat-
bewegung

In Schema I ist der Transport von einem Mol Monokarboxylat durch den Co-Transport von einem Mol H^+ -Ionen begleitet. Das Verhältnis zwischen dem Netto- H^+ -Transport und dem Netto-Monokarboxylat-Transport muß aber nicht unbedingt 1:1 sein (12,17). Das läßt sich aus den Versuchen mit markiertem ^{14}C -DMO und 3H -Inulin errechnen: der DMO-Raum beträgt $0.75 \text{ ml (g Leber)}^{-1}$ und der Inulinraum $0.35 \text{ ml (g Leber)}^{-1}$. Demnach sind bei 10 mM DMO im Perfusat $4 \mu\text{mol (g Leber)}^{-1}$ DMO intrazellulär, während der Netto-Transport an H^+ -Ionen nur $0.8 \mu\text{mol (g Leber)}^{-1}$ beträgt (s. Tab. 3, Spalte 4). Das Verhältnis zwischen dem Netto- H^+ -Ionen- und dem Netto-DMO-Transport beträgt also ungefähr 1:5. Ein ähnlicher Wert errechnet sich mit 3H -Benzoat; da der 3H -Benzoatraum $1.1 \text{ ml (g Leber)}^{-1}$ ($n=12$) beträgt, sind bei 10 mM Benzoat im zufließenden Perfusat $7.5 \mu\text{mol (g Leber)}^{-1}$ Benzoat in der Zelle. Bei einem Netto-Transport von $1.6 \mu\text{mol } H^+\text{-Ionen (g Leber)}^{-1}$ ergibt sich wieder ein Verhältnis von ungefähr 1:5. Das bedeutet, daß sich hier mehrere Translokationsprozesse überlagern.

Es besteht eine lineare Konzentrationsabhängigkeit zwischen dem Netto- H^+ -Ionen- und dem Netto-Monokarboxylat-Transport (s. Fig. 2 und 3) bei den niedrigen Konzentrationen, wie sie hier verwendet werden. Folglich sind die überlagernden Translokationsprozesse ebenfalls linear konzentrationsabhängig.

Für den Austausch von Monokarboxylaten gegen andere Monokarboxylate wird das gezeigt (Fig. 4 A, Fig. 7, Fig. 8). Eine quantitativ exakte Aussage für diesen Effekt zu treffen ist schwierig, weil die Gesamtkonzentration an austauschbaren Monokarboxylaten in den Zellen unbekannt ist. Außerdem kommt noch ein Austausch von anderen Anionen, z. B. Chlorid gegen Monokarboxylate vor, wie er bei Mitochondrien nachgewiesen ist.

Weiterhin besteht die Möglichkeit eines Austausches von Protonen gegen Kationen (z. B. von H^+ gegen Na^+ oder von H^+ gegen K^+) (15,38). Auch die Existenz einer K^+ -bindenden Substanz wird diskutiert (56). Berücksichtigt werden muß ebenso die Ausscheidung von Anionen auf der Gegenseite der funktionell polaren Zelle in die Gallenwege (28).

Die Wahl des Transportmechanismus an der Zellmembran hängt von der Temperatur ab: bei 0° Celsius wird die H^+ -Bewegung von einem Transport monovalenter Kationen in entgegengesetzter Richtung begleitet; bei 25° Celsius wird die H^+ -Bewegung begleitet von einer gleichsinnigen Anionenbewegung (Protonen-Anionen-Symport) (27).

IV. 7 Geschwindigkeit der Translokationsprozesse

Bei der hämoglobinfrei perfundierten Leber können kurzzeitige Effekte mit einfachen Mitteln kontinuierlich verfolgt werden. So zeigt Fig. 4, daß die H^+ -Bewegungen, welche die CO_2 -Bewegungen begleiten, nach ungefähr zwei Minuten beendet sind, der gleichzeitige Monokarboxylat-Monokarboxylat-Austausch aber schon nach 40 Sekunden. Beim Anstieg sind die Halbwertszeiten bei beiden Effekten ähnlich, beim Abfall unter-

scheiden sie sich. Das bedeutet, daß die Kurve die Summe mehrerer Prozesse zeigt. Eine nähere Aufschlüsselung dieser Begleiteffekte wäre wichtig für ein tieferes Verständnis der Reaktionen, die mit dem CO_2 -Transport verbunden sind.

Für die Aquilibrierung von Monokarboxylaten aus unterschiedlichen Gleichgewichtszuständen benötigt die perfundierte Leber 40 bis 60 Sekunden. In einem ähnlichen System wurde für die mit H_2 -Elektroden gemessene lokale Auswaschung von Wasserstoff die gleichen Zeiten benötigt (26).

IV. 8 Austausch von Monokarboxylaten gegen Monokarboxylate

In der perfundierten Leber ist der Monokarboxylat-Monokarboxylat-Austausch gut zu beobachten, da aus dem abfließenden Medium praktisch beliebig viele Proben entnommen werden können, während die Messung der Metabolitkonzentration im Lebergewebe durch Gefrierstopptechnik erfolgt. Hier zeigen Fig. 7 den Laktat-Bikarbonat-, Fig. 4 den Benzoat-Bikarbonat- und Fig. 8 den Benzoat-Azetat-Austausch. Entsprechend dem Schema II bewirkt die vorübergehende intrazelluläre Ansäuerung diesen Austausch, da Gleichung (I) für jede schwache Säure gilt. Die unterschiedliche Benzoatabgabe in Fig. 8 unter den Bedingungen von "2.5% CO_2 " und "10% CO_2 " wird verständlich aus den unterschiedlichen intrazellulären pH-Werten.

Die oben erwähnten Begleiteffekte wie Protonen-Kationen-Austausch oder Monokarboxylat-Anion-Austausch bedürfen noch weiterer Erforschung, ehe das komplexe System der vielen voneinander abhängigen Gleichgewichtssysteme, die beim Aufbau der extra- und intrazellulären Gradienten beteiligt sind, voll verstanden wird.

V. Zusammenfassung

1. Der intrazelluläre pH ist abhängig von der Konzentration und der Art des extrazellulären Puffersystems. Wenn man bei der isolierten, hämoglobinfrei perfundierten Rattenleber die Gesamtkonzentration an CO_2 im Perfusat von 2.5 Vol% auf 10 Vol% erhöht, dann sinkt - bei konstantem extrazellulären pH - der intrazelluläre pH um 0.3 Einheiten.

Dies wird mit zwei Methoden nachgewiesen.

- (1) Es wird eine neue Methode verwendet, die darauf beruht, daß H^+ -Ionenverschiebungen den Austausch von Monokarboxylaten durch die Plasmamembran beim Ausgleich eines Monokarboxylatgradienten begleiten.
- (2) Die Ergebnisse werden bestätigt durch die Messung der 5,5-Dimethyloxazolidin-2,4-dion- (DMO)-Verteilung und durch die Freisetzung von Monokarboxylaten aus den Zellen während der Erhöhung der CO_2 -Konzentration.

2. Wird der üblicherweise verwendete $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Puffer durch neuerdings häufiger eingesetzte zwitterionische nichtflüchtige Puffer wie N-2-Hydroxyäthylpiperazin-N'-äthansulfonsäure (HEPES) oder Morpholinopropan-sulfonsäure (MOPS) ersetzt, ist der intrazelluläre pH-Wert um bis zu 0.5 Einheiten

höher. Außerdem sinkt das Membranpotential um bis zu 20 mV, wie aus Messungen anderer Arbeitsgruppen an Zellkulturen hervorgeht.

3. Bei Zugabe der Monokarboxylate (in Konzentrationen zwischen 0 - 10 mM) findet sich zwischen der Netto- H^+ -Aufnahme durch die Leberzelle und den hinzugefügten Monokarboxylaten eine nahezu lineare Abhängigkeit. Dabei lassen sich nach der quantitativen Aufnahme zwei Gruppen unterscheiden: bei den aromatischen schwachen Säuren wie Benzoat und Salizylat beträgt die H^+ -Aufnahme bei einer Zugabe von 10 mM im üblicherweise verwendeten HCO_3^-/CO_2 -System (25 mM/ 1.2 mM) $1.5 - 1.6 \mu\text{Mol} \times (\text{g Leber})^{-1}$; dagegen nur $0.6 - 0.8 \mu\text{Mol} \times (\text{g Leber})^{-1}$ bei den kurzkettigen aliphatischen schwachen Säuren wie Azetat, Laktat, Pyruvat und DMO (5,5-Dimethyl-oxazolidin-2,4-dion).

Bei Dikarboxylaten wie Phthalat oder Succinat sind keine nennenswerten Netto- H^+ -Ionenbewegungen zu beobachten, wie auf Grund der pK-Werte zu erwarten ist.

VI. Literaturverzeichnis

1. Wagner P. D. (1977)
Physiol. Rev. 57, 2, 257 - 312.
2. Newton P. E. (1977)
Fed. Proc. 36 (3), 446, Abstract No. 922.
3. Satellite Symposium of the XXV International
Congress of Physiology, July 1971, Monte-Carlo,
(Nahas & Schaefer K. E., Herausgeber) Springer-
Verlag, New York-Heidelberg-Berlin, 1974
4. Hastings A. B. & Longmore W. J. (1965)
Adv. Enzyme Regul. 3, 147 - 159.
5. Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber
(1968), (Staib W. & Scholz R., Herausgeber) S. 25,
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-NewYork.
6. Krebs H. A. & Henseleit H. (1932)
Z. Physiol. Chem. 210, 33 - 66.
7. Bergmeyer H. U., Herausgeber (1974) Methoden der
enzymatischen Analyse, 3. Auflage, Verlag Chemie,
Weinheim.
8. Conway E. J. (1957) Physiol. Rev. 37, 84 - 95.
9. Overton E. (1895) Vierteljahresschr. Naturforsch.
Ges. Zür. 40, 159 - 201.
10. Overton E. (1899) Vierteljahresschr. Naturforsch.
Ges. Zür. 44, 88 - 135.
11. Conway E. J. & Downey M. (1950)
Biochem. J. 47, 355 - 360.

12. Sies H. & Noack G. (1972) FEBS Lett. 22, 193 - 196.
13. Sies H., Noack G. & Bücher Th. (1972) Abstr.
Commun. 8th Meet. Fed. Eur. Biochem. Soc., Nr. 82.
14. Hohorst J. H., Kreutz F. H. & Bücher Th. (1959)
Biochem. Z. 332, 18 - 36.
15. Mitchell P. & Moyle J. (1969)
Eur. J. Biochem. 9, 149 - 155.
16. Siesjö B. K. & Pontén U. (1966)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 133, 180 - 189.
17. Bücher Th., Brauser B., Conze A., Klein F.,
Langguth O. & Sies H. (1972) Eur. J. Biochem. 27,
301 - 317.
18. Cockburn M., Earnshaw P. & Eddy A. A. (1975)
Biochem. J. 146, 705 - 712.
19. Klingenberg M. (1970) Essays Biochem. 6, 119 - 159.
20. Waddell W. J. & Butler Th. C. (1959)
J. Clin. Invest. 38, 720 - 729.
21. Poole D. T., Butler Th. C. & Waddell W. J. (1964)
J. Nat. Cancer Inst. 32, 939 - 946.
22. Palmieri F., Quagliariello E. & Klingenberg M.
(1970) Eur. J. Biochem. 17, 230 - 238.
23. Spencer T. L. & Lehninger A. L. (1976)
Biochem. J. 154, 405 - 414.

24. Donnan F. G. (1911)
Z. f. Elektrochemie 17, 572 - 580.
25. Sies H., Noack G. & Halder K. H. (1973)
Eur. J. Biochem. 38, 247 - 258.
26. Thermann M. & Kessler M. (1973) in Oxygen Supply
(Kessler M., Bruley D. F., Clark L. C., Lübbers D. W.,
Silver I. A. & Strauss J., Herausgeber) 117 - 119,
Urban & Schwarzenberg-Verlag, München-Berlin-Wien.
27. Reijngoud D. J. & Tager J. M. (1975)
FEBS-Letters 54, 76 - 79.
28. Wisher M. J. & Evans W. H. (1975)
Biochem. J. 146, 375 - 388.
29. Addanki S., Cahill F. D. & Sotos J. F. (1967)
Science 155, 1678 - 1679.
30. Thomas J. A. & Johnson D. L. (1975)
Fed. Proc. 34, 579.
31. Sies H. & Halder K. H. (1973) Abstr. Ninth Int.
Congr. Biochem. Stockholm S. 279, Nr. 517.
32. Struyvenberg A., Morrison R. B. & Relman A. S.
(1968) Am. J. Physiol. 214, 1155 - 1162.
33. Adler Sh. (1972) J. Clin. Invest. 51, 256 - 265.
34. Waddell W. J. & Bates R. G. (1969)
Physiol. Rev. 49, 285 - 329.
35. Van der Meer R. & de Haan E. J. FEBS-abstracts
Paris, 20. - 25. Juli 1975, 10th Meeting of the
Federation of European Biochem. Soc. Nr. 1436.

36. Hannan A. F. & Wiggins Ph. M. (1976)
Biochim. Biophys. Acta 428, 205 - 222.
37. Williams J. A., Withrow C. D. & Woodbury D. M.
(1971) J. Physiol. 212, 101 - 115.
38. Friedmann N. (1972) Biochim. Biophys.
Acta, 274, 214 - 225.
39. Spitzer K. W. & Hogan P. M. (1977)
Fed. Proc. 36 (3) 416, Abstract No. 784.
40. Longmore W. J., Niethe C. M. & McDaniel M. L.
(1969) J. Biol. Chem. 244, 6451 - 6457.
41. Werdan K. & Heldt H. W. (1972)
Biochim. Biophys. Acta 283, 430 - 441.
42. Thomas R. C. (1974) J. Physiol. 238, 159 - 180.
43. Caldwell P. C. (1956) Int. Rev. Cytol. 5, 229 - 277.
44. Hsung J. C. & Haug A. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 389, 477 - 482.
45. Good N. E., Winget G. D., Winter W., Connolly Th. N.,
Izawa S. & Singh R. M. M. (1966)
Biochemistry 5, 467 - 477.
46. Nielsen R. (1972) Biochim. Biophys. Acta 288,
457 - 466.
47. Hülser D. F. (1971) Pflügers Arch. 325, 174 - 187.

48. Donaldson S. K. B. & Hermansen L. (1977)
Biophys. Journal 17, (2) Abstract No. 201.
49. Green J. W. (1949)
J. Cell Comp. Physiol. 33, 247 - 266.
50. Weiner M. (1973) in Handbook of Physiology,
Section 8: Renal Physiology (Orloff J. A. &
Berliner R. W., Herausgeber) pp. 521 - 554
American Physiological Soc., Washington, D. C.
51. Harold F. M. & Levin E. (1974)
J. Bacteriol. 117, 1141 - 1148.
52. Halestrap A. P. & Denton R. M. (1974)
Biochem. J. 138, 313 - 316.
53. Oldendorf W. H. (1973)
Am. J. Physiol. 224, 1450 - 1453.
54. Giebel O. & Passow H. (1960)
Pflügers Arch. 271, 378 - 388.
55. Van Lamsweerde-Gallez D. & Meessen A. (1975)
J. Membrane Biol. 23, 103 - 137.
56. Besenfelder E. & Siebert G. (1975)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 495 - 506.

Lebenslauf

Geboren am 8. Februar 1949 in München als Sohn des
Zuschneidermeisters Artur Georg Halder und dessen
Ehefrau Maria, geborene Gaar.

1955-1961 Besuch der Volksschule München, Amalienstr.

1961-1965 Städt. Friedrich-List-WAS, München

1965 Mittlere Reife

1965-1966 Übergangsklasse, daselbst

1966-1969 Städt. Adolf-Weber-Gymnasium in München

1969 Reifeprüfung

Beginn des Medizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-
Universität München im Wintersemester 1969/70.

Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung
nach dem Sommersemester 1970.

Ablegung der ärztlichen Vorprüfung nach dem
Wintersemester 1971/72.

Im Herbst 1972 Beginn der Untersuchungen zur vor-
liegenden Dissertation bei Herrn Priv. Doz.

Dr. H. Sies am Institut für Physiologische Chemie,
physikalische Biochemie und Zellbiologie der
Universität München.

Ablegung der ärztlichen Prüfung an der Universität
München am 18. Dez. 1975.

Anschließend Medizinalassistenten-Zeit in Erding
und Rosenheim.

Approbation als Arzt am 18. April 1977.

Seither Assistenzarzt am Städt. Krankenhaus Rosenheim.

Meinem Doktorvater, Herrn Priv. Doz. Dr. Helmut Sies, danke ich herzlich für die wertvollen Anregungen und seine stets aufgeschlossene Haltung mir und meiner Arbeit gegenüber.

Frau Annegret Marklstorfer danke ich für die ausgezeichnete technische Anleitung und Unterstützung.

